

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Oktober 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/095640 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/000550

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. März 2005 (29.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 015 143.1 27. März 2004 (27.03.2004) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **KLEIN, Hanns-Georg** [DE/DE]; Labor für
Medizinische Genetik Dr. Klein, Lochhamer Str. 29,
82152 Martinsried (DE).

(74) Anwalt: **ARTH, Hans-Lothar**; Arth, Bucher & Kolle-
gen, Am Klopferspitz 19 (IZB), 82152 München-Martin-
sried (DE).

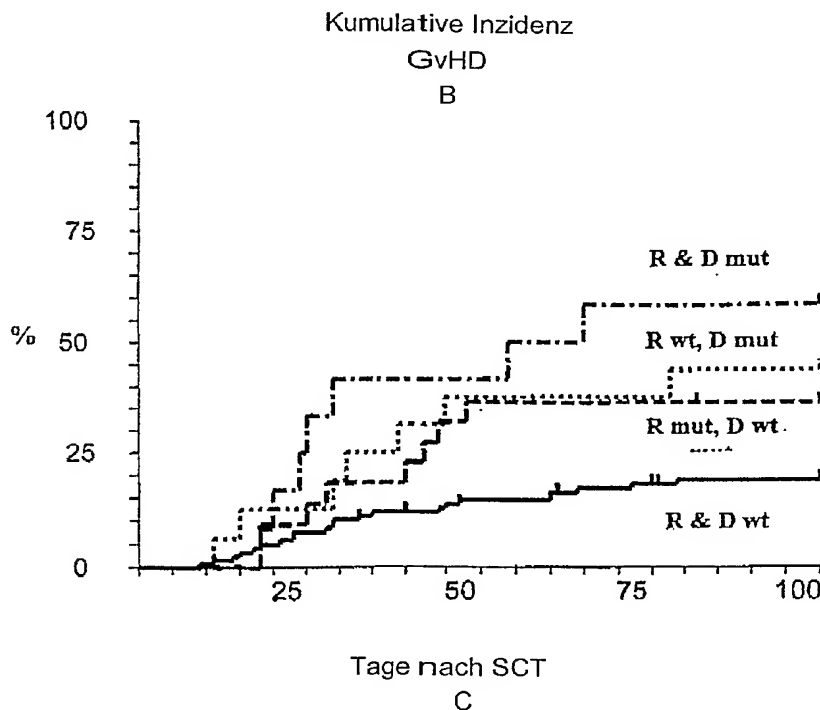
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: POLYMORPHISMS IN NOD2/CARD15 GENE

(54) Bezeichnung: POLYMORPHISMEN IM NOD2/CARD15 GEN



(57) Abstract: The invention relates to methods and to nucleotide sequences that are used in said methods for predicting and/or diagnosing diseases that are linked to at least one of the Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren sowie in diesen Verfahren verwendete Nucleotidsequenzen zur Vorhersage und/oder Diagnose von Krankheiten, welche mit mindestens einem der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen in Verbindung stehen.

B... CUMULATIVE INCIDENCE
C... DAYS AFTER SCT

WO 2005/095640 A1



GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Polymorphismen im NOD2/CARD15 Gen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren sowie in diesen Verfahren verwendete Nucleotidsequenzen zur Vorhersage und/oder Diagnose von Krankheiten, welche mit mindestens einem der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen in Verbindung stehen und insbesondere die
10 Auswahl geeigneter Spender-Empfänger-Paare für Transplantationen aufgrund der nachgewiesenen Polymorphismen Nod2-SNP8 (8), Nod2-SNP12 (12), Nod2-SNP13 (13) im NOD2/CARD15 Gen.

Die Einzelnucleotidpolymorphismen (SNP: single nucleotide polymorphism) 8, 12,
15 13 im NOD2/CARD15 Gen werden für das Auftreten der Crohnschen Krankheit verantwortlich gemacht (Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Nature 2001, 411, 599-603; Ogura Y, Bonen DK, Inohara N Nature 2001, 411, 603-606). Bei der Crohnschen Krankheit handelt es sich um eine zwar seltene, aber verheerende chronisch wiederkehrende Entzündung des Verdauungstraktes, die vor allem
20 Dün- und Dickdarm befällt. Dabei kommt es zu einer Verdickung der Darmwand und zu Geschwürbildungen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es nun, Verfahren zur Vorhersage und Diagnose von Krankheiten bereitzustellen, welche durch die Mutationen/Varianten
25 Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen ausgelöst oder initiiert werden. Insbesondere besteht die Aufgabe darin, Verfahren zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen, Sepsis und anderer nach Transplantationen auftretender Erkrankungen bereitzustellen, welche zur Auswahl geeigneter Spender-
30 Empfänger-Paare dienen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung von Verfahren gemäß Anspruch 1 gelöst. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen, Aspekte und Details der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Beispielen
35 und den Figuren.

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Vorhersage und/oder Diagnose von mit mindestens einem der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen assoziierten Krankheiten durch Nachweis

mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen.

5 Anders ausgedrückt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zum Nachweis mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen zur Vorhersage und/oder Diagnose von mit diesem Gendefekt bzw. einer Mutation bzw. einer Genvarianten assoziierten Krankheiten.

10 Das NOD2/CARD15 Gen hat folgende Gene Bank Accession Number: AC007728 und AQ534686. Die Nucleotidsequenz ist unter den angegebenen Accession Nummern aus der NCBI-Datenbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> erhältlich.

15 Das NOD2-Gen ist 3123 Nukleotide lang (1040 Aminosäuren, Gene Bank Accession number NM_022162), (NOD: Nucleotide Oligomerisation Domain) und befindet sich in der perizentromerischen Region des Chromosoms 16 (16p12-q21). Die Nomenklatur des Gens NOD2 wurde inzwischen geändert zu CARD15 (CARD: Caspase Activating Recruitment Domain). Caspasen spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Neben der CARD Domäne besitzt NOD2/CARD15 eine ATB Bindungsdomäne. NOD2/CARD15 dient als
20 intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Produkte und transduziert das Signal zur Aktivierung von NFkappaB (NF-κB).

In dem NOD2/CARD15 Gen können unter anderem Einzelnucleotid-polymorphismen (SNPs) Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 auftreten.
25 SNPs entstehen durch einen Basenaustausch oder Insertion einer zusätzlichen Base in die DNA-Sequenz.

30 SNP8 (SNP Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>, Accession Number ss2978536) bezeichnet einen Polymorphismus im NOD2/CARD15 Gen, der durch den Austausch des Nucleotids Position 2209 (NM_022162) C → T entsteht. Resultierend findet im Protein der Austausch von R702W statt. SNP8 befindet sich im Chromosom 16 an der Chromosomenposition 50523959 (NOD2/CARD15 Gen - Exon 5). Hugot JP et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001, 411, 599–603.

35 SNP12 (SNP Datenbank, Accession Number ss2978537) bezeichnet einen Polymorphismus im NOD2/CARD15 Gen, der durch den Austausch des Nucleotids Position 2827 (NM_022162) G → C entsteht. Resultierend findet im Protein der Austausch von G908R statt. SNP12 befindet sich im Chromosom 16

an der Chromosomenposition 50534573 (NOD2/CARD15 Gen- Exon 9). Hugot JP et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001, 411, 599–603

- 5 SNP13 (SNP Datenbank, Accession Number ss2978539) bezeichnet einen Polymorphismus im NOD2/CARD15 Gen, der durch 1 Base Insertion des Nucleotids C am Nucleotid Position 3124 (NM_022162). SNP13 befindet sich im Chromosom 16 an der Chromosomenposition 50541811^50541812. Durch die Insertion resultiert ein Frameshift, der ein verkürztes NOD2 mit 1007 Aminosäuren bedingt (Ogura et al., Nature 2001, 411, 603-606).

Durch die oben genannten Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP 12, Nod2-SNP13 entstehen folgende 7 Mutanten / Varianten, nämlich

- 15 Mutante 1: Mutation durch SNP8,
Mutante 2: Mutation durch SNP12,
Mutante 3: Insertion durch SNP13,
Mutante 4: Mutationen durch SNP8 und 12,
Mutante 5: Mutation und Insertion durch SNP8 und 13,
Mutante 6: Mutation und Insertion durch SNP12 und 13,
20 Mutante 7: Mutationen und Insertion durch SNP8, 12 und 13.

Überraschenderweise konnte nachgewiesen werden, dass bereits eine der vorgenannten Mutationen ausreicht um diverse Krankheiten auszulösen. Die vorgenannten Mutationen stehen beispielsweise mit Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin, Graft-versus-Host-Erkrankungen, Host-versus-Graft-Erkrankungen, Sepsis, Lungenerkrankungen, Monozyten- und/oder Makrophagen-abhängige Erkrankungen, Lymphom, Leukämie (z.B. akute myeloische Leukämie, chronische myeloische Leukämie, akute lymphatische Leukämie) in Verbindung.

30 Unter Monozyten-abhängige Erkrankungen sind unter anderem Krankheiten zu verstehen, welche durch eine Fehlfunktion von Monozyten ausgelöst werden, wie beispielsweise Monozytosen, Entzündungen der Herzklappen, Leberzirrhose, monozytäre Leukämien, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphome, Chronisch Myeloische Leukämie, multiples Myelom, maligne Histiozytose, Eierstock-, Magen- und Brusttumoren sowie Melanom, Lupus Erythematoses, Rheumatoide Arthritis, Sarkoidose, Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Hand-Schüller-Christiansche Erkrankung. Demnach umfassen Makrophagen-abhängige
35 Erkrankungen Krankheiten, welche durch eine Makrophagenfehlfunktion ausgelöst werden. Dazu zählen beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen.

Als Lungenerkrankungen kommen beispielsweise chronische Bronchitis und Bronchiolitis obliterans in Frage.

Zu den Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen zählen insbesondere immunologische Reaktionen des Empfängers gegen das Spenderorgan als auch Transplantat gegen Wirt Reaktionen (GvHD: Graft versus Host Disease). Derartige Folgen treten relativ spät nach einer Transplantation auf und können zu lebensbedrohlichen Komplikation führen.

- 10 Diese Problematik soll am Beispiel der Blutstammzelltransplantation, herkömmlich als Knochenmarktransplantation bekannt, verdeutlicht werden. Beispiele für Transplantationen sind insbesondere Rückenmark-, Knochenmark-, Stammzell- und Blutstammzelltransplantationen sowie Transplantationen solider Organe wie beispielsweise Herz, Lunge, Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse, Haut, 15 hormonproduzierende Drüsen sowie Keimdrüsen.

- Die Blutstammzelltransplantation kann zur Therapie unterschiedlicher Störungen der Blutbildung sowie des Immunsystems eingesetzt werden, welche sich beispielsweise nach Chemotherapien oder anderer die Blutbildung zerstörender 20 Therapien ergeben können. Die Störungen des Immunsystems oder bei der Blutbildung können aber auch angeborener oder erworbener Natur sein. Probleme bei der Blutstammzelltransplantation können insbesondere dann auftreten, wenn der Spender genetisch nicht identisch ist (allogener Spender), da in diesem Fall eine doppelte immunologische Barriere überwunden werden muss. 25 Denn zu der möglichen Abstoßung der transplantierten Zellen durch das Immunsystem des Empfängers (HvG-Reaktion) kommt auch noch die Möglichkeit des Auftretens immunologischer Reaktionen des Transplantats gegen den Empfänger (GvH-Reaktionen) hinzu.

- 30 Ein Faktor, der die Wahrscheinlichkeit von Abstoßungsreaktionen wesentlich mitbestimmt, ist die Übereinstimmung der HLA (Human Leukocyte Antigen)-Haplotypen zwischen Spender und Empfänger.

- Die vorliegende Erfindung offenbart unter anderem nun einen weiteren 35 wesentlichen Faktor für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Abstoßungsreaktionen, nämlich das Vorliegen mindestens eines der Polymorphismen SNP8, SNP12 oder SNP13 im NOD2/CARD15 Gen. Insbesondere nachteilig wirkt sich das Vorliegen mindestens eines dieser Polymorphismen bei dem Spender und dem Empfänger aus.

Die Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR), welche durch T-Lymphozyten, die im Transplantat des Spenders enthalten sind, ausgelöst wird, kann zu einer GvHD führen. Bei der GvHD wird eine akute und eine chronische Form unterschieden.

Per definitionem tritt die akute GvHD innerhalb der ersten 100 Tage nach der Transplantation und bei bis zu 50% der Transplantierten auf. Die chronische GvHD tritt nach dem 100. Tag bei etwa 30-50% der allogenen Transplantierten auf. Entsprechend der Symptomatik und klinischen Laborwerte kann die GvHD in vier Stadien (GvHD-I, GvHD-II, GvHD-III, GvHD-IV) mit unterschiedlichen Prognosen eingeteilt werden.

Eine weitere schwere und oft tödlich verlaufende Folgeerkrankung nach Transplantationen ist Sepsis, welche beispielsweise durch mit dem Transplantat übertragene Bakterien ausgelöst werden kann. Ca. 100.000 Menschen erkranken in Deutschland jährlich an einer Sepsis, 40.000 von ihnen sterben daran. Bei einer Sepsis überschwemmen keine den gesamten Organismus und vergiften das Blut, wodurch Niere, Leber und Lunge versagen können. Sepsis ist eine Killerkrankheit, welche von Bakterien, Pilzen oder Viren hervorgerufen wird und jeden plötzlich treffen kann.

In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Sepsis überraschenderweise dann vermehrt auftritt, wenn Spender und Empfänger einen der Polymorphismen SNP8, SNP12 und/oder SNP13 aufweisen.

Ferner wurde überraschend gefunden, dass bereits eine der vorgenannten Mutationen ausreicht um diverse Krankheiten auszulösen, welche mit einer Störung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges in Verbindung stehen. Eine Störung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges kann sowohl eine Inhibierung als auch eine Aktivierung bedeuten. Die in Verbindung mit einer Störung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges stehenden Krankheiten werden somit durch eine Aktivierung oder Inhibierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges initiiert, ausgelöst, verschlimmert und/oder hervorgerufen. Zu diesen Krankheiten zählen beispielsweise Krebsarten mit Mutationen in den Rel/NF- κ B/I κ B-Genen sowie viele andere Krebsarten mit einer Überaktivität und/oder Überexpression von NF- κ B in den Tumorzellen. Ferner zählen zu dieser Krankheiten kardiovaskuläre Erkrankungen, Erkrankungen des Herzens, Erkrankungen der Niere, Arteriosclerose sowie Atherosclerose. Signifikant gesteigert ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens solcher Erkrankungen nach Transplantationen,

wenn sowohl Empfänger als auch Spender mindestens einen der hierin beschriebenen Polymorphismen aufweisen.

5 Insbesondere vorteilhaft ist die Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren für die Prätransplantationsdiagnostik. Die erfindungsgemäßen Verfahren ermöglichen die Vorhersage von Abstoßungsreaktionen des Empfängers gegenüber dem Spenderorgan sowie Transplantat gegen Wirt Reaktionen (GvHD) und dienen somit dazu, für einen bestimmten Empfänger ein geeignetes Spenderorgan auszuwählen. Insbesondere treten dann Abstoßungsreaktionen
10 auf, wenn sowohl der Empfänger als auch der Spender eine der oben beschriebenen Mutationen 1 – 7 aufweisen, wie weiter unten noch ausführlich ausgeführt wird.

15 Die erfindungsgemäßen Verfahren umfassen das Bereitstellen einer Probe, welche das Gen NOD2/CARD15 enthält und die anschließende Analyse des Gens NOD2/CARD15 auf das Vorliegen mindestens einer der oben beschriebenen Mutationen 1 – 7. Vorzugsweise wird für die Untersuchung genomische DNA oder cDNA oder RNA verwendet.

20 Als Probe können Blut, Speichel / Mundschleimhautzellen, Knochenmark, Urinsediment, Punktatflüssigkeit, Zell- sowie Gewebeproben verwendet werden, wobei Blutproben bevorzugt sind.

25 Bezüglich der Prätransplantationsdiagnostik ist es zudem bevorzugt, eine Probe des Empfängers sowie separat davon auch eine Probe des Spenders zu untersuchen. Insbesondere bevorzugt ist somit ein Diagnoseverfahren, welches zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Transplantat gegen Wirt Reaktionen dient, umfassend die folgenden Schritte:

- 30 a) Bereitstellung einer Probe des Spenders enthaltend das Gen NOD2/CARD15 sowie eine Probe des Empfängers enthaltend das Gen NOD2/CARD15,
b) Detektion der beiden Proben auf das Vorliegen eines oder mehrerer der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13.

35 Die nachfolgende Auswahl von passenden Spender-Empfänger-Paaren erfolgt nach dem Grundsatz der Minimierung des Risikos bezüglich der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Transplantat gegen Wirt Reaktionen. Weist der Empfänger bereits mehr als einen Polymorphismus auf, d.h. weist der

Empfänger eine der Mutationen Nr. 4, 5, 6 oder 7 auf, dann sollte der Spender keinen einzigen Polymorphismus, d.h. keine der Mutationen Nr. 1 – 7 besitzen. Ein besonderes hohes Risiko von GvHD besteht, wenn sowohl Spender als auch Empfänger einen Polymorphismus aufweisen und ein nochmals gesteigertes Risiko, wenn Spender und Empfänger insgesamt mehr als zwei Polymorphismen aufweisen, z.B. beim Spender die Mutation 5 und beim Empfänger die Mutation 1, oder beim Spender die Mutationen 4 und beim Empfänger die Mutation 6.

Das vorgenannte Verfahren umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform die Schritte:

- a) Bereitstellung einer Probe des Spenders sowie des Empfängers enthaltend das Gen NOD2/CARD15,
- b) Isolation der DNA und/oder RNA aus beiden Proben,
- c) Durchführung getrennter Polymerasekettenreaktionen mit für das Gen NOD2/CARD15 spezifischen Primern für isolierte DNA und/oder RNA des Spenders als auch für die isolierte DNA und/oder RNA des Empfängers,
- d) Untersuchung des Gens NOD2/CARD15 des Spenders als auch des Gens NOD2/CARD15 des Empfängers auf das Vorliegen mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Abschätzung bzw. Vorhersage von Abwehrreaktionen beim Empfänger nach erfolgter Transplantation von Zellen oder eines Organs. Bei diesem Verfahren wird eine Probe des Empfängers und eine Probe des Spenders bereitgestellt. Der Begriff "Probe" ist oben definiert und bezeichnet insbesondere eine Blutprobe. Die Probe des Spenders als auch die Probe des Empfängers werden auf das Vorliegen der Polymorphismen SNP8, SNP12, SNP13 untersucht. Vorzugsweise erfolgt diese Untersuchung durch die Isolation von DNA und/oder RNA, vorzugsweise DNA aus beiden Proben. Die aus der Probe des Spenders isolierte DNA und/oder RNA wird mittels PCR vervielfältigt und anschließend zum Nachweis der Polymorphismen mit Oligonucleotiden versetzt, welche eine zum Polymorphismus SNP8 oder SNP12 oder SNP13 komplementäre Sequenz aufweisen und zur Hybridisierung mit dem Bereich des Gens NOD2/CARD15 befähigt sind, der den Polymorphismus Nod2-SNP8 bzw. Nod2-SNP12 bzw. Nod2-SNP13 enthält. Die Oligonucleotide weisen bevorzugt zwischen 10 und 50 Nucleotidbausteine (Nucleobasen) auf. Eingesetzt werden drei Arten von Oligonucleotiden, nämlich solche mit einer komplementären Sequenz zu dem

Abschnitt des NOD2/CARD15 Gens, der den SNP8 Polymorphismus enthält sowie solche mit einer komplementären Sequenz zum dem Abschnitt des NOD2/CARD15 Gens, der den SNP12 Polymorphismus enthält und solche mit einer komplementären Sequenz zum dem Abschnitt des NOD2/CARD15 Gens, der den SNP13 Polymorphismus enthält. Das Auftreten von Hybridisierung belegt das Vorhandensein eines Polymorphismus. Die Art der hybridisierenden Oligonucleotide gibt Auskunft darüber, welcher Polymorphismus vorliegt und ob mehrere Polymorphismen vorliegen. Die PCR wird mit für das Gen NOD2/CARD15 spezifischen Primern durchgeführt.

Die Probe des Empfängers wird zur Vervielfältigung der darin enthaltenen DNA und/oder RNA auch einer PCR unterzogen und zum Nachweis von Polymorphismen mit den gleichen Oligonucleotiden versetzt.

Das erfindungsgemäße Verfahren gibt nun Auskunft darüber, ob beim Spender oder beim Empfänger oder bei Spender und Empfänger Polymorphismen vorliegen. Ferner kann bestimmt werden, welche und wie viele der drei Polymorphismen vorliegen. Je nach Ergebnis kann die Wahrscheinlichkeit von Abwehrreaktionen beim Transplantatempfänger abgeschätzt werden, wodurch sich die Möglichkeit ergibt, zueinander passende Spender-Empfänger-Paare auszuwählen und die Wahrscheinlichkeit von Folgeerkrankungen aufgrund der Transplantation zu minimieren.

Unter Folgeerkrankungen oder Abwehrreaktionen werden insbesondere Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen, Graft-versus-Host-Erkrankungen, Host-versus-Graft-Erkrankungen, Lungenerkrankungen, Monozyten- und/oder Makrophagen-abhängige Erkrankungen, Lymphom, Leukämie und/oder Erkrankungen verstanden, welche mit einer Störung des NFkappaB-Signaltransduktionsweges in Verbindung stehen.

In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen einer der Polymorphismen mit dem gehäuften Auftreten von Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen, Graft-versus-Host-Erkrankungen, Host-versus-Graft-Erkrankungen, Sepsis, Lungenerkrankungen, Lymphom, Leukämie, Monozytosen, Entzündungen der Herzklappen, Leberzirrhose, monozytäre Leukämien, Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphome, Chronisch Myeloische Leukämie, multiples Myelom, maligne Histiozytose, Eierstockkrebs, Magenkrebs, Brustkrebs, Melanome, Lupus Erythematoses, Rheumatoide Arthritis, Sarkoidose, Colitis

Ulcerosa, Morbus Crohn, Hand-Schüller-Christiansche Erkrankung, kardiovaskuläre Erkrankungen, Erkrankungen des Herzens, Erkrankungen der Niere, Arteriosklerose, Atherosklerose, chronische Bronchitis und Bronchiolitis obliterans korreliert. Die erfindungsgemäßen Verfahren führen zu Ergebnissen, welche eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der vorgenannten Erkrankungen zulassen. Insbesondere der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer oder mehrerer der vorgenannten Erkrankungen beim Empfänger nach Transplantationen.

- 10 Wie oben ausgeführt, erfolgt nach dem Bereitstellen einer Probe, welche das Gen NOD2/CARD15 enthält, die Untersuchung des Gens bezüglich des Vorliegens mindestens einer der oben genannten Mutationen 1 – 7 bzw. mindestens eines der Polymorphismen 8, 12, 13. Diese Untersuchung dann durch verschiedene Methoden erfolgen, welche bevorzugt die Isolation der DNA aus der Probe mit
15 nachfolgender Durchführung einer PCR (Polymerase Chain Reaction) mit für das Gen NOD2/CARD15 spezifischen Primern umfassen.

Als Primer können beispielsweise die in THE LANCET 2002, 359, 1661-1665 beschriebenen eingesetzt werden.

20

Die durch PCR erhaltenen Nucleotide können dann unter Verwendung diverser Methoden auf das Vorliegen der Mutationen untersucht werden. Zu diesen Methoden zählen beispielsweise:

- Primerextensionsverfahren, mutationsspezifische Hybridisierung, ARMS-Technologien, Array-Technologien, Chip-Technologien, DNA-Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse (RFLP),
25 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP), denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese, Gelelektrophorese mit Temperaturgradient, denaturierende HPLC, elektrochemische Nachweisverfahren. Insbesondere bevorzugt ist die Messung von Hybridisierungssignalen von markierten
30 Hybridisierungssequenzen.

Kurz Beschreibung der Methoden

- Ein Verfahren zum Nachweis bekannter SNPs oder Mutationen, welches in der Routinediagnostik zum Einsatz kommt, ist die allelspezifische Hybridisierung von
35 fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden (allelspezifische Oligonucleotidhybridisierung oder ASO). Bei dieser Technik wird der PCR eine Wildtyp- und eine mutationsspezifische Sonde zugesetzt, deren Fluoreszenz erst sichtbar wird,

nachdem die zuvor spezifisch gebundene Sonde durch die DNA-Polymerase im Zuge der Strangelongation abgebaut wurde (sog. Exonuklease-Assay). Je nachdem, ob Wildtyp oder SNP/Mutation vorliegt, erhält man unterschiedliche Farbsignale, welche nach Anregung durch Laserlicht in einer Photozelle detektiert werden. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der Teilautomatisierbarkeit, wodurch größere Probenzahlen schneller bearbeitet werden können.

Ein neueres, in Schweden entwickeltes Verfahren zum Nachweis bekannter Mutationen oder SNPs ist das **Pyrosequencing**. Ähnlich der klassischen DNA-Sequenzanalyse mit dem Sanger-Verfahren (s.u.) kann mittels Pyrosequencing die DNA-Sequenz direkt analysiert werden. Allerdings beruht die Reaktion nicht auf der Detektion von Fluoreszenzsignalen von eingebauten Stop-Nukleotiden, sondern auf einer messbaren Freisetzung von Licht, wenn das jeweils passende Nukleotid bei der Strangelongation in die DNA eingebaut wird. Insbesondere werden zum Nachweis des Vorliegens einer Mutation Hybridisierungssequenzen, d.h. Oligonucleotide mit komplementären Sequenzen eingesetzt, welche vorzugsweise Detektionsmarker tragen.

Eine weitere Methode zur Analyse bekannter Polymorphismen oder SNPs ist der Nachweis über sequenzspezifische Sonden mittels **LightCycler**. Dabei wird zu einem DNA-Templat ein spezieller Reaktionsmix gegeben, der u.a. Primer und spezifische Sonden enthält. Für die Detektion eines SNP wird jeweils ein Sondenpaar benötigt, das aus einer Anker- und einer Sensor-Sonde besteht. Beide Sonden binden in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander an die zu analysierende Sequenz. Nach Exzitation des Fluoresceinmoleküls an der Ankersonde kommt es zum Energietransfer auf das LC-Red-Molekül an der Sensorsonde (Fluoreszenz-Resonanz-Transfer, FRET-Assay). Das von der Sensorsonde emittierte Licht wird gemessen und steht dafür, dass die Sonden korrekt an die Zielsequenz gebunden sind. Die Ermittlung des Genotyps erfolgt über eine Schmelzkurvenanalyse.

Ein Verfahren, welches sich besonders zum simultanen Nachweis mehrerer bekannter Mutationen (sog. Multiplexanalyse) eignet, ist der **Oligonukleotid-Ligation-Assay (OLA)**. Der OLA kommt vorwiegend in Stufe II (Analyse auf die häufigsten Mutationen) der CFTR-Diagnostik zum Einsatz. In einer Multiplex-PCR-Reaktion werden 15 Zielregionen des CFTR-Gens amplifiziert. Die PCR-Produkte aus der Multiplex-PCR dienen als Ausgangsmoleküle für eine Ligationreaktion, die durch Zugabe eines OLA-Reagenzes gestartet wird. Das OLA-

Reagenz enthält Oligonukleotide, welche teilweise fluoreszenzmarkiert sind sowie eine DNA-Ligase. Bei der Reaktion werden 3 Sondentypen eingesetzt: a) eine gemeinsame ("common") Sonde, die am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (blau, grün oder gelb) markiert ist, b) 29 wildtypspezifische Sonden und c) 31 mutationsspezifische Sonden. Die gemeinsame Sonde bindet an die Zielsequenz unabhängig davon, ob eine Wildtyp- oder mutante Sequenz vorliegt. Die Wildtyp- und Mutationssonden unterscheiden sich nur durch ein Nukleotid am 3'-Ende. Am 5'-Ende von Wildtyp- und Mutationssonde hängt jeweils ein sog. PEO-Molekül, dessen Länge spezifisch für jede nachzuweisende Zielsequenz ist. Die Wildtyp- und Mutationssonden konkurrieren um die Bindungsstelle an die Zielsequenz, wobei nur die Sonde bindet, die exakt mit der Zielsequenz komplementär ist. Liegt keine der 31 zu analysierenden Mutationen vor, binden nur die Wildtypsonden. Ist eine Mutation homozygot vorhanden, bindet nur die Mutationssonde. Bei Heterozygotie binden sowohl Wildtyp- wie auch Mutationssonde an die Zielsequenz. Die DNA-Ligase verknüpft die gemeinsame und Wildtyp- oder Mutationssonde nach Hybridisierung an die Zielsequenz. Jedes Ligationsprodukt kann nun über seine spezifische Länge und die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der gemeinsamen Sonde kapillarelektrophoretisch nachgewiesen werden.

Somit bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf Oligonucleotide, welche aus mindestens 10 Nucleotidbausteinen bestehen, eine zur Mutation SNP8 und/oder SNP12 und/oder SNP13 komplementäre Sequenz aufweisen und zur Hybridisierung mit dem Bereich des Gens NOD2/CARD15 befähigt sind, der den Polymorphismus Nod2-SNP8 und/oder Nod2-SNP12 und/oder Nod2-SNP13 enthält.

Beziehungsweise betrifft die vorliegende Erfindung Oligonucleotide bestehend aus mindestens 10 Nucleotiden, wobei die Oligonucleotide eine zum NOD2/CARD15 Gen komplementäre Sequenz haben und die komplementären Nucleotide zur Mutation SNP8 und/oder SNP12 und/oder die Nucleotidinsertion SNP13 enthalten.

Derartige Oligonucleotide tragen bevorzugt Detektionsmarker zur spektroskopischen Analyse bzw. zur Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzbasierten Analyse. Ferner bestehen die Oligonucleotide bevorzugt aus 15 – 50 Nucleotidbausteinen und insbesondere bevorzugt aus 18 – 22 Nucleotidbausteinen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Vorrichtung für die Diagnose der Polymorphismen bzw. Mutationen des NOD2/CARD15 Gens. Bei dieser Vorrichtung handelt es sich bevorzugt um einen Diagnosechip oder Mikrochip, der mindestens eines der vorgenannten Oligonukleotide enthält. Bei dieser Mikroarray- oder Mikrochip-Technologie werden auf speziellen Trägern, die zumeist aus Glas oder Nylon bestehen, in hoher Dichte tausende verschiedener Gene in Form von cDNA Fragmenten oder genspezifischen Oligonucleotiden mit Hilfe von Robotern aufgetragen (= DNA-Chips).

Anstelle des Einsatzes von DNA-Proben können auch RNA-Proben zum Nachweis der Polymorphismen eingesetzt werden. Die RNA-basierten Verfahren benötigen jedoch Proben von Zellen, welche auch das NOD2/CARD15 Gen exprimieren.

Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt die kumulative Inzidenz von schwerer akuten GvHD (Grad III/OV) in Bezug zu NOD2/CARD15 SNPs: R= Empfänger, D= Spender; R&D wt = nicht-mutantes Wildtyp SNPs in R und D (n=119); R mut, D mut = mutante SNPs nur in Empfänger (n = 22); R wt, D mut = mutantes SNPs nur in Spendern (n=16), R & D mut = mutantes SNPs in Spender und Empfänger (n=12). Die Unterschiede waren hoch signifikant: p 0,001 für die ganzen Gruppen; p 0,02 für R mut D wt; p 0,004 für R wt/Dmut und p 0,001 für R & D mut wenn es mit nicht mutantern R & D verglichen wurde.

Figur 2+3: zeigt die kumulative Inzidenz von 1 Jahr TRM in Bezug auf NOD2/CARD15 SNPs: wt = nicht-mutante SNPs sowohl in Empfängern als auch in Spendern; mut = irgendein mutiertes SNP in Spendern oder Empfängern oder in beiden.

Figur 2 zeigt die HLA-identischen Schwester-Transplantate; wt: n=55, mut n=23

Figur 3 zeigt HLA nicht verwandte Spender-Transplantate; wt: n= 61, mut; n = 25

Beispiele

Methoden

- 5 169 aufeinander folgende Patienten, die für die allogenen Stammzelltransplantation aufgenommen wurden, wurden in die Studie einbezogen. Konditionierung und prophylaktische Immunsuppression wurde nach Standardprotokollen durchgeführt. Konditionierung mit reduzierter Intensität (RIC) bestand aus Fludarabine, BCNU und Melphalan. 78 Patienten erhielten
- 10 Transplantate von HLA-identischen Geschwistern (MRD, matched related donors), 87 Patienten ohne Beziehung zu Spendern (URD, unrelated donors) und in 4 Patienten diente ein Verwandter, der sich in einem HLA-Antigen unterschied (RD) als Spender. In der nicht-verwandten Spendergruppe passten Spender/Empfänger Paare für HLA A, B, DRB1 und DQB1 wie durch
- 15 Niedrigauflösung durchgeführte Typisierung für Klasse I und durch Hochauflösung durchgeführte Typisierung für Klasse II festgelegt wurden. Wohingegen in den verbleibenden 23 Paaren eine oder zwei Allelabweichungen für DRB1 und DQB1 akzeptiert wurden. Der Grad der GvHD wurde gemäß den Glucksberg-Kriterien (Glucksberg H et al. Transplantation 1974, 18, 295-304)
- 20 bestimmt. Die Hauptvariablen wie Transplantat bezogene Mortalität (TRM= Tod in Remission) und die Todesursachen wurden in eine monatliche aktualisierte Datenbank aufgenommen. Mediane Beobachtungszeit für überlebende Patienten oder nach einem Rezidiv sterbende Patienten war 450 Tage (Bereich 30-1767 Tage), mediane Beobachtungszeit für an TRM sterbende Patienten war
- 25 172 Tage (Bereich 14-1065 Tage).

Kollektion von DNA-Proben

- 30 DNA aus 169 Patienten (Empfänger) und von 168 Spendern wurde zum Zeitpunkt der Stammzelltransplantation aus Blutproben nach Standardmethoden präpariert, eingefroren und retrospektiv analysiert, um die Rolle von NOD2/CARD15 Mutationen zu beurteilen.
- 35 Allellische Diskriminierung des NOD2/CARD15 Gens:
- Einzelnukeotid Polymorphismen NOD2-SNP8, NOD2-SNP12 und NOD2-SNP13 wurden durch ein Taqmanprotokoll bestimmt wie in Hampe et al. The Lancet, 2002, 359, 1661-1665 beschrieben.

Kontrollproben, die durch DNA-Sequenzierung überprüft wurden, wurden in jedem TaqMan Lauf miteinbezogen. Sonden wurden mit einem Reporter Farbstoff 6-FAM oder TET kovalent am 5' Ende und der Quencher Farbstoff TAMRA wurde am 3' Ende der Sonde gekoppelt. Die Primer und Sonden wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Folgende Primer und Sonden wurden verwendet:

Für NOD2-SNP8 Polymorphismus

Primer: 1) 5' TTCCTGGCAGGGCTGTTGTC 3' (vor)

10 2) 5' AGTGGAAAGTGCTTGCGGAGG 3' (rück)

Sonde: 1) 5' FAM-CCTGCTC**C**GGCGCCAGGC– TAMRA 3'

2) 5' TET-CCTGCTC**T**GGCGCCAGGC- TAMRA 3'

Für NOD2-SNP12 Polymorphismus

15 Primer: 1) 5' ACTCACTGACACTGTCTGTTGACTCT 3' (vor)

2) 5' AGCCACCTCAAGCTCTGGTG 3' (rück)

Sonde: 1) 5' FAM-TTTTCAGATTCTGG**G**GCAACAGAGTGGGT– TAMRA 3'

2) 5' TET- TTCAGATTCTGG**C**GCAACAGAGTGGGT - TAMRA 3'

20 ***Für NOD2-SNP13 Polymorphismus***

Primer: 1) 5' GTCCAATAACTGCATCACCTACCTAG 3' (vor)

2) 5' CTTACCAGACTTCCAGGATGGTGT 3' (rück)

Sonde: 1) 5' FAM-CCCTCCTGCAGG**CCCT**TGAAAT–TAMRA 3'

2) 5' TET- CCTCCTGCAGG**CCCT**TGAAA - TAMRA 3'

25

Der optimierte Reaktionsmix mit einem Endvolumen von 10 µl bestand aus Universal Master Mix (PE Applied Biosystems), 400 nM von jedem Primer (vor und rück, siehe oben), 250 nM von jeder fluorogenen Sonde (siehe oben) und die DNA-Matrize (20 ng/well). Alle Reaktionen wurden in einer 384-Lochplatte (Abgene, epsom, Uk) durchgeführt und mit Hilfe des Thermocyclers Primus-HT (MWG Biotech) amplifiziert. Die Konditionen für die PCR-Zyklen waren wie folgt: 50°C für 2 Minuten, dann 95°C für 10 Minuten gefolgt von 40 Zyklen von 95°C für 15 Sekunden (Schmelzschrift) und 60°C für 1 Minute. Nach dem PCR-Lauf wurde die freigesetzte Fluoreszenz mit dem ABI PRISM® 7700 Sequenz-

30

35 Detektionssystem (PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) gemessen.

Erhöhungen in der Menge an Reporterfarbstofffluoreszenz während der 40 Zyklen der Amplifikation wurden durch den Sequenz Detektor (SDS Version 1.6, PE Applied Biosystem) aufgezeichnet. Veränderungen in der Reporter Farbstofffluoreszenz des 6-FAM gegen Veränderung des Reporterfarbstoffs TET wurden graphisch ermittelt (homozygotes FAM gegen homozygotes TET gegen heterozygotes FAM/TET).

Klinische und statistische Analysen

Drei Hauptvariablen (TRM an 365 Tagen = 1 Jahr TRM, Gesamt-Grad von schweren GvHD (Grad III/IV) und Stadium von gastrointestinalen GvHD) wurden in Bezug auf NOD2/CARD15 Mutationen analysiert. Kumulative Inzidenz, die das konkurrierende Risiko des Todes von anderen Toxizitäten oder Rezidiven von GvHD reflektiert und Todesfälle von Rezidiven für TRM wurden für jeden dieser Parameter berechnet. Die Zeit zum klinischen Ereignis (TRM/GvHD) wurde ab Stichtag des SCT (Stammzelltransplantation) für Gesamt-GvHD und gastrointestinales GvHD gemessen. Die klinischen Ereignisse wurden bis Tag 100 und für 1 Jahr TRM bis Tag 365 nach SCT in das Modell miteinbezogen. Schrittweise multivariante COX-Regressionsmodelle wurden angepasst und testeten die unabhängige prognostische Relevanz von NOD2/CARD15 Mutationen. Die Grenze für reverse Selektionsprozeduren war die Fehlerwahrscheinlichkeit 0.2. Für den multivariaten Vergleich von Risikofaktoren für TRM und GvHD wurde nur das Alter der Patienten, Krankheitsstadium am Tage der Transplantation, Spendertyp (HLA-identische Geschwister versus URD versus RD) und NOD2/CARD15 Mutationsstatus betrachtet. Für die Analyse von NOD2/CARD15 SNPs wurde die weniger häufigen mit Crohn's Krankheit und einer eingeschränkten NF-kB Produktion assoziierten Hochrisikoallele als mutiert definiert wohingegen die häufiger beobachteten Allele als Wildtyp definiert wurden. Für die Analyse der Mutationen in Bezug auf das klinische Ereignis wurden die Gruppen gemäß 1) Auftreten von irgendwelchen Mutationen in Empfänger und Spendern und 2) in Bezug auf das Auftreten von irgendwelchen Mutation in Empfängern allein, Spender allein oder beide gebildet. Kumulatives Auftreten erlaubt die Einstellung auf konkurrierendes Risiko, das mit Hilfe NCSS Software (Version 2004), weitere statistische Analysen durch die Hilfe von der SPSS Software (Version 11.05) berechnet wurde.

Ergebnisse:

Frequenz der mutierten NOD2/CARD15 Allele:

NOD2/CARD15 Mutationen ereigneten sich mit einer Häufigkeit von 21,8% in
5 Patienten und 13,7% in Spendern, die in dieser Studie einbezogen wurden. Eine
homozygote Mutation wurde in nur einem Patienten und in seinem HLA-
identischen Spender beobachtet, wohingegen alle anderen Patienten und
Spender mit Mutationen heterozygot waren. Berechnete Haplotyphäufigkeit für
10 mutiertes NOD2-SNP8 war 0.056 für Empfänger (R) und 0.045 für Spender (D),
für mutiertes NOD2-SNP12 0.021 (R) und 0.009 (D), und für mutiertes NOD2-
SNP13 0.027 (R) und 0.034 (D). Deshalb waren die Haplotyphäufigkeiten nahe
dem Bereich der Kontrollen. Dies resultierte in einem Gesamtprozentsatz von
70,5% der Transplantate, wo sowohl Spender als auch Empfänger nicht-mutierte
SNPs (Wildtypgruppe) hatten. In 22 Paaren (13%) hatten nur die Empfänger
15 mutierte SNPs (R mut), in 16 Paaren (9,5%) traten Mutationen nur in Spendern
auf (D mut), wohingegen in 12 Paaren (7%) sowohl Spender als auch Empfänger
Mutationen offenbarten (R & D mut). In unserer aufeinander folgende Kohorte
von Patienten waren sowohl die Spender spezifischen Charakteristiken als auch
die Transplantat spezifische Prozeduren gleichmäßig zwischen Patienten/Spender
20 Paaren mit und ohne Mutationen verteilt.

Klinisches Ereignis in Bezug zum Auftreten von NOD2/CARD15 Mutationen in Spender und Empfängern

Patienten wurden für ein Median von 16 Monaten verfolgt (Bereich 0,5 bis 59
25 Monate). Zuerst verglichen wir das Ereignis bei Patienten von Wildtyp
Empfänger/Spender Paar (n=119) mit dem Ereignis bei Patienten in Paaren mit
irgendwelchen Mutationen (n=50): Im allgemeinen war schweres GvHD Grad
III/IV, schweres gastrointestinales GvHD und TRM nach 1 Jahr in Paaren mit
NOD2/CARD15 Mutationen verglichen mit der Wildtypgruppe signifikant erhöht
30 (siehe Tabelle 1) Todesfälle von Rezidiven traten in beiden Gruppen auf: 18 in
den 119 Patienten mit Wildtyp und 7 aus 50 Patienten in mutierten Paaren.

Es gab ein erhöhtes Risiko von schweren Gesamt-GvHD in Transplantaten mit
Spendermutationen, wenn die Mutationen gemäß dem Auftreten in Empfänger
oder Spender oder in beiden getrennt wurde. Zusätzlich gab es eine dramatische
35 Erhöhung für die Gesamt- und gastrointestinale GvHD in den kleinen Subgruppen
von Paaren mit Mutationen von Empfänger als auch Spendern. Wie in Tabelle 2
gezeigt, erhöhte sich das kumulative Auftreten von 1 Jahr TRM von 20% im
Wildtyp-Empfänger /Spender Paare auf 49% in Paaren die eine

Empfängermutation ($p=0.003$), auf 59% in Paaren, die eine Spendermutation ($p=0.004$) und auf 83% in Paaren, die eine Empfänger und Spendermutation tragen ($p=0.001$). Nochmals, Todesfälle von Rezidiven waren fast gleichmäßig in diesen Subgruppen verteilt.

5

Die starke Assoziation von TRM mit NOD2/CARD15 Mutation wurde partiell durch ein erhöhtes Risiko nicht nur für den Tod durch GvHD aber auch durch respiratorisches Versagen in Folge diffuser primärer oder sekundärer pulmonarer Schäden erklärt: Wohingegen in der Wildtypgruppe nur 11/30 Todesfällen (37%) in Remissionen durch GvHD und respiratorisches Versagen verursacht wurde. Der Anteil erhöhte sich zu 17/26 (65%) in Paaren mit NOD2/CARD15 Mutationen.

10

Figur 1 und Tabelle 2 zeigen die kumulative Inzidenz (Kum. Inz.) von schwerer akuten GvHD (Grad III/OV) in Bezug zu NOD2/CARD15 SNPs. Im Vergleich zu Wildtyp (19%) erhöhte sich die kumulative Inzidenz auf 36% bzw. 44% im Falle von Mutationen entweder im Empfänger oder Spender und auf 58% im Falle von Mutationen in beiden (R & D mut).

15

20 ***Relevanz der Beobachtungen für HLA-identische Geschwister gegenüber nicht-verwandten Spendertransplantaten und multivariante Analyse des Risikofaktors assoziiert mit TRM;***

Die Relevanz von Spendern und Empfänger-Mutationen wurden in den verschiedenen immunogenen in dieser Studie einbezogenen Subgruppen verglichen. Obwohl die Korrelation des Auftretens von TRM mit NOD2/CARD15 Mutationen deutlicher für die HLA-identischen Geschwistertransplantate war, gab es einen parallelen Trend für URD Transplantate (siehe Figur 2, Tabelle 3). In der URD Gruppe stieg das kumulative Auftreten der 1 Jahr TRM von 27% in Wildtyppaaren auf 55% in mutanten Paaren, wenn der Empfänger und Spender für HLA A, B, DRB1 und DQB1 glichen. TRM erhöhte sich von 29% auf 50 % in Paaren mit ein oder zwei DRB1 oder DQB1 Allel-Abweichungen.

25

30

Die kleine Gruppe von Transplantaten, die Antigenabweichungen aufzeigen, zeigte eine hohe Mortalität und erlaubte keine Beurteilung der Rolle von NOD2/CARD15 Mutationen in dieser besonderen Subgruppe. In der multivariante Cox Regressionsanalyse waren Alter, Spendertyp und NOD2/CARD15 Mutationen in Spendern alleine oder in Empfänger als auch in

35

Spender unabhängige Risikofaktoren für TRM. Wie in Tabelle 4 gezeigt war das Zufallsverhältnis (hazard ratio) für TRM nach allogener SCT betreffend NOD2/CARD15 Mutation 2.4 (p= 0.02; 95% CI [1.1;5.0]) für Empfänger-Mutationen, 2.5 (p = 0.02; 95% CI [1.2; 5.4]) für Spender-Mutationen und 6.0 (p=0; 95% CI [2.6;14.1]) im Fall der simultanen Mutationen von Spender und Empfänger. GvHD (p = 0.006) als auch NOD2/CARD15 Mutationen (p= 0) blieben signifikante Risikofaktoren für TRM, wenn die allgemeine GvHD Grad IV als Risikofaktor für TRM in das Modell einbezogen wurde. Sogar wenn schwere GvHD Grad III/IV einbezogen wurde, blieb die Verteilung der NOD2/CARD15 Mutation signifikant, dass die starke und unabhängige Auswirkung der NOD2/CARD15 Mutation auf den Krankheitsverlauf (Befund) nach allogener SCT bestätigte.

Tabelle 1:

	Kumulative Inzidenz	95% KI Kum. Inz.	p	HR	95% KI HR
GvHD III/IV					
Wildtyp	19%	13% – 27%		1,0	
Mutante	44%	32% - 60%	0,001	2,7	1,5 – 4,9
GI GvHD					
Wildtyp	18%	12% - 27%		1,0	
Mutante	40%	28% - 56%	0,004	2,5	1,4 – 4,7
TRM 1 Jahr					
Wildtyp	20%	14% - 29%		1,0	
Mutante	58%	45% - 75%	0	2,8	1,7 – 4,9

Tabelle 1 zeigt die univariante Analyse der kumulativen Inzidenz der aktuellen GvHD Grad III/IV, gastrointestinales GvHD Stadium 2-4 und 1 Jahr TRM. Patienten/Spender-Paare mit nicht-mutiertem (Wildtype) NOD2/CARD15 (n=119) wurden gegenüber den Paaren mit Empfänger- oder Spender-Mutationen (mutated, n=50) verglichen. Cox-Regression wurde eingesetzt um die Gruppen zu vergleichen und Hazard Ratios zu analysieren.

Tabelle 2:

	Kumulative Inzidenz	95% KI Kum. Inz.	p	HR	95% KI HR
GvHD III/IV					
Wildtyp	19%	13% – 27%		1,0	
R pos	36%	21% - 61%	0,07	2,1	0,9 – 4,7
D pos	44%	25% - 76%	0,002	2,8	1,2 – 6,5
R & D pos	58%	36% - 94%	0,002	3,9	1,7 – 9,2
GI GvHD					
Wildtyp	18%	12% - 27%		1,0	
R pos	36%	21% - 63%	0,07	2,1	0,9 – 4,8
D pos	31%	15% - 65%	0,16	2,0	0,8 – 5,3
R & D pos	56%	36% - 94%	0,001	4,3	1,8 – 10,1
TRM 1 Jahr					
Wildtyp	20%	14% - 29%		1,0	
R pos	49%	31% - 76%	0,03	2,2	1,1 – 4,6
D pos	59%	38% - 91%	0,004	3,1	1,4 – 6,5
R & D pos	83%	65% - 100%	0,001	3,9	1,7 – 8,6

Tabelle 2 zeigt die detaillierte kumulative Inzidenz für GvHD Grad III/IV, gastrointestinales Stadium 2-4 und 1 Jahr TRM bezogen auf Spender und Empfänger NOD2/CARD15 Mutationen: Wildtype: nicht-mutierte Spender und Empfänger (n=119). R pos = Mutation nur in Empfängern (n=22), D pos = Mutationen nur in Spendern (n=16); R & D pos = Mutationen sowohl in Empfängern als auch in Spendern (n = 12). Cox-Regression wurde eingesetzt um die Gruppen zu vergleichen und Hazard Ratios zu analysieren.

Tabelle 3 zeigt die univariante Analyse der kumulativen Inzidenz von 1 Jahr TRM in Patienten/Spender Paaren mit Wildtyp NOD2/CARD15 gegenüber Paaren mit entweder Empfänger- (R pos) oder Spender-Mutationen (D pos) sowie Mutationen in beiden (R & D pos). Separate Analysen wurden für HLA-identische Geschwister Transplantation und URD Transplantate durchgeführt. Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit der log rank Analyse durchgeführt. 95 CI confidence intervals.

Tabelle 3:

	Kumulative Inzidenz	95% KI Kum. Inz.	p	HR	95% KI HR
HLA-id. sibl.					
Wildtyp (55)	14%	18% – 42%		1,0	
R pos (9)	74%	49% - 100%	0,	7,9	2,6 – 24,0
D pos (6)	58%	27% - 100%	0,022	4,9	1,3 – 18,9
R & D pos (8)	75%	50% - 100%	0,004	6,4	1,8 – 23,0
URD					
Wildtyp (61)	28%	18% - 42%		1,0	
R pos (13)	36%	14% - 73%		1,1	0,4 – 3,3
D pos (9)	31%	13% - 100%		2,4	0,9 – 6,5
R & D pos (4)	56%	100%	0,01	4,2	1,4 – 12,5

Tabelle 4 zeigt die multivariante Risikofaktor-Analyse für 1 Jahr TRM. Relevante Patienten und Spender Prätransplantatcharakteristika wurden mit NOD2/CARD15 Mutation in Empfängern (R pos), Spendern (D pos) und beiden (R & D ps) verglichen.

Tabelle 4:

	N	Auftritt TRM 1Jahr	Risiko	95% CI	p
Alter					
bis 40 Jahre	58	15	1,0		
ab 40 Jahre	111	38	2,2	1,1 – 4,0	0,02
Stadium bei Tx					
früh	95	27	1,0		
fortgeschritten	74	26	1,3	0,7 – 2,2	
Donortyp					
HLA = sibl	78	20	1,0		
nicht verw.	87	29	1,7	0,9 – 3,2	
HLA df.rel.	4	4	10,7	3,4 – 33,3	0
NOD2/CARD15					
Wildtyp	119	26	1,0		
R pos	22	10	2,4	1,1 – 5,0	0,02
D pos	16	9	2,5	1,2 – 5,4	0,02
R & D pos	12	8	6,0	2,6 – 14,1	0,001

Patentansprüche

1. Verfahren zur Vorhersage und/oder Diagnose von mit mindestens einem der Polymorphismen 8, 12, 13 im NOD2/CARD15 Gen assoziierten Krankheiten durch Nachweis mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei den mit mindestens einem Polymorphismus Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13 im NOD2/CARD15 Gen assoziierten Krankheiten um Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen, Graft-versus-Host-Erkrankungen, Host-versus-Graft-Erkrankungen, Sepsis, Lungenerkrankungen, Monozyten- und/oder Makrophagen-abhängige Erkrankungen, Lymphom, Leukämie und/oder Erkrankungen handelt, welche mit einer Störung des NFkappaB-Signaltransduktionsweges in Verbindung stehen.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, umfassend die Schritte
 - a) Bereitstellung einer Probe enthaltend das Gen NOD2/CARD15 bzw. NOD2/CARD15-Nukleinsäuren,
 - b) Untersuchung des Gens NOD2/CARD15 auf das Vorliegen mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 3, umfassend die Schritte
 - a) Bereitstellung einer Probe enthaltend das Gen NOD2/CARD15,
 - b) Isolation der DNA und/oder RNA aus der Probe,
 - c) Durchführung einer PCR mit für das Gen NOD2/CARD15 spezifischen Primern,
 - d) Untersuchung des Gens NOD2/CARD15 auf das Vorliegen mindestens eines der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13.
5. Verfahren zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen gemäß eines der vorherigen Ansprüche, umfassend die folgenden Schritte:
 - c) Bereitstellung einer Probe des Spenders enthaltend das Gen NOD2/CARD15 sowie eine Probe des Empfängers enthaltend das Gen NOD2/CARD15,

d) Detektion der beiden Proben auf das Vorliegen eines oder mehrerer der Polymorphismen Nod2-SNP8, Nod2-SNP12, Nod2-SNP13.

5 6. Oligonucleotid bestehend aus mindestens 10 Nucleotiden, wobei das Oligonucleotid eine zum NOD2/CARD15 Gen komplementäre Sequenz hat und das komplementäre Nucleotid zur Mutation SNP8 und/oder SNP12 und/oder die Nucleotidinsertion SNP13 enthält.

10 7. Oligonucleotid gemäß Anspruch 6, wobei das Oligonucleotid des weiteren einen Detektionsmarker enthält.

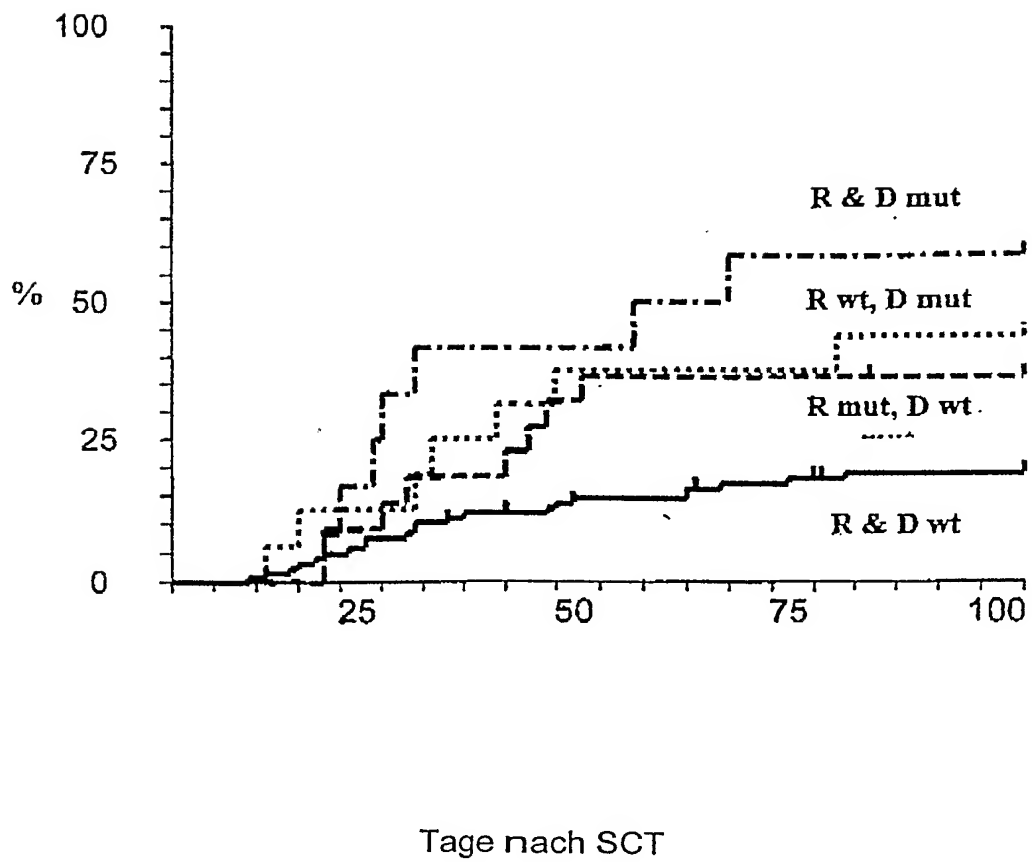
8. Mikrochip umfassend mindestens ein Oligonucleotid nach Anspruch 6 oder 7.

15

Figuren

Figur 1

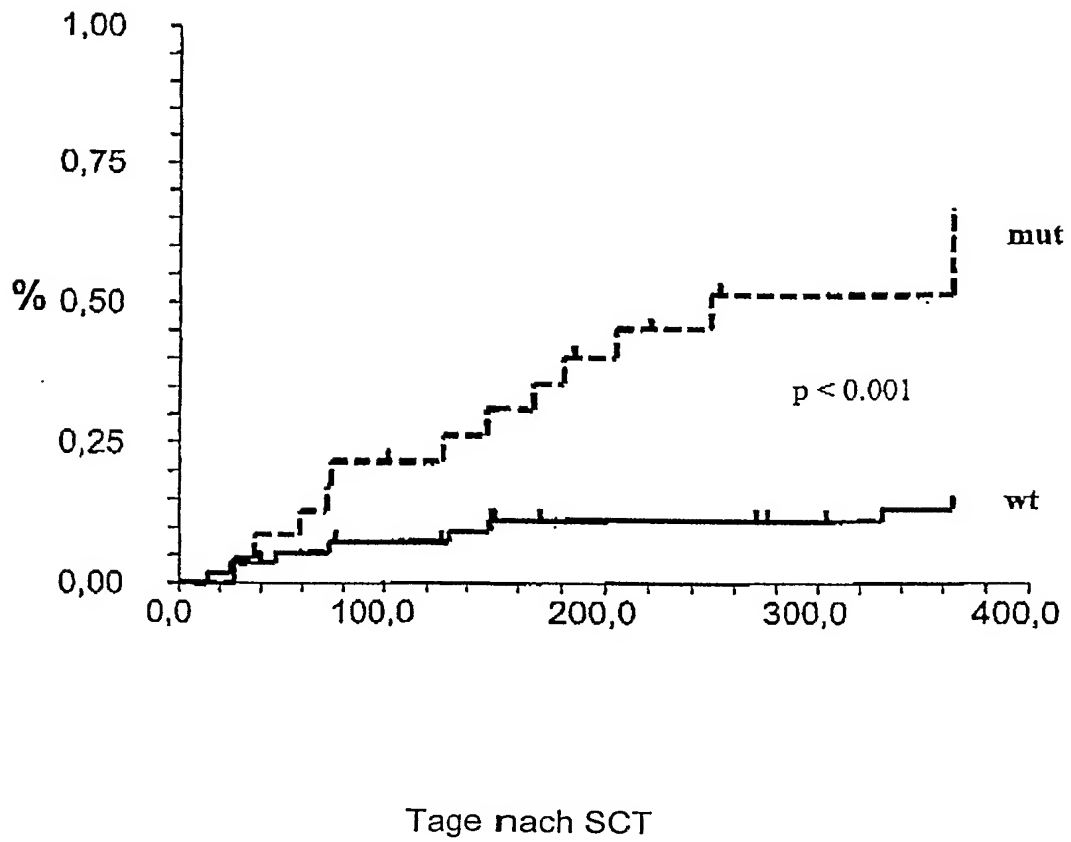
Kumulative Inzidenz
GvHD



Figur 2

Kumulative Inzidenz

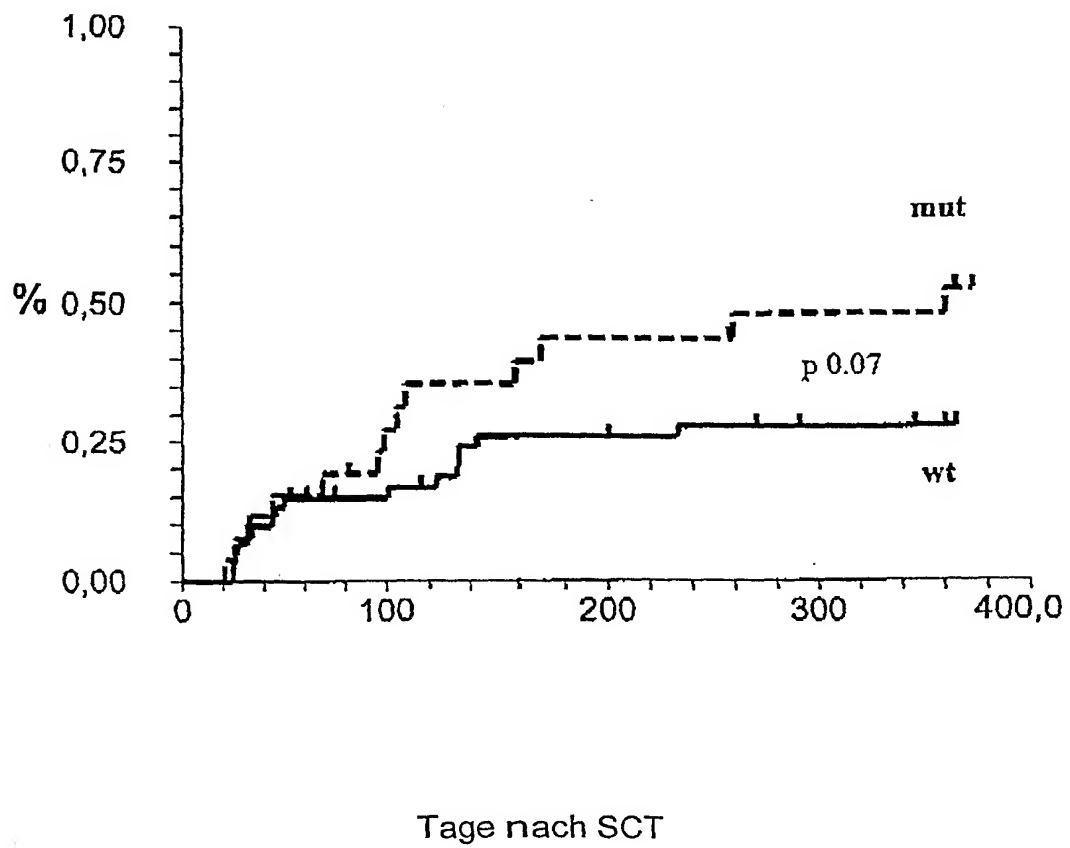
1 Jahr TRM HLA-identische Geschwister



Figur 3

Kumulative Inzidenz

1 Jahr TRM URD



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/000550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/44426 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN; THE UNIVERSITY OF CHICAGO; NUNE) 6 June 2002 (2002-06-06)	1-4, 6-8
A	page 62, line 21 - page 65 page 119 page 125 claims 1-12; figures 11,17,23,25,26; examples 9,10; tables 1-6; sequences 33,56,58 & DATABASE Geneseq 'Online! 16 October 2002 (2002-10-16), "Nod2 exon 11 DNA sequence SEQ ID No 105." retrieved from EBI accession no. GSN:ABT05811 Database accession no. ABT05811 ----- -/--	5

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 August 2005

Date of mailing of the international search report

25/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schmitt, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/000550

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/053263 A1 (ABREU MARIA T ET AL) 18 March 2004 (2004-03-18)	1-4,6-8
A	claims 1-15; figures 5-7; example 2; table 3; sequences 48,50,52	5
X	LESAGE SUZANNE ET AL: "CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS. APR 2002, vol. 70, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 845-857, XP002340892 ISSN: 0002-9297	1-4,6-8
A	the whole document	5
X	HAMPE J ET AL: "Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 359, no. 9318, 11 May 2002 (2002-05-11), pages 1661-1665, XP004790813 ISSN: 0140-6736	6-8
X	the whole document	
X	RAHMAN P ET AL: "CARD15: a pleiotropic autoimmune gene that confers susceptibility to psoriatic arthritis." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS. SEP 2003, vol. 73, no. 3, September 2003 (2003-09), pages 677-681, XP002340893 ISSN: 0002-9297	1-4,6-8
X	the whole document	
X	HUGOT JEAN-PIERRE ET AL: "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 411, no. 6837, 2001, pages 599-603, XP002177308 ISSN: 0028-0836	1-4,6-8
A	cited in the application the whole document	5
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/000550

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OGURA YASUNORI ET AL: "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 411, no. 6837, 2001, pages 603-606, XP002177309 ISSN: 0028-0836 cited in the application	1-4,6-8
A	the whole document	5
A	WO 03/060468 A (THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 24 July 2003 (2003-07-24) claims 1,2 the whole document	1-5
P,X	HOLLER ERNST ET AL: "Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation" BLOOD, vol. 104, no. 3, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 889-894, XP002340894 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE2005/000550

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0244426	A	06-06-2002	AU 4341502 A	11-06-2002
			CA 2427471 A1	06-06-2002
			EP 1404712 A2	07-04-2004
			US 2002197616 A1	26-12-2002
			WO 0244426 A2	06-06-2002
US 2004053263	A1	18-03-2004	AU 2003263834 A1	19-03-2004
			EP 1556405 A2	27-07-2005
			WO 2004020968 A2	11-03-2004
WO 03060468	A	24-07-2003	AU 2002364098 A1	30-07-2003
			CA 2471513 A1	24-07-2003
			EP 1468008 A2	20-10-2004
			JP 2005514932 T	26-05-2005
			WO 03060468 A2	24-07-2003
			US 2003215446 A1	20-11-2003

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/000550

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	WO 02/44426 A (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN; THE UNIVERSITY OF CHICAGO; NUNE) 6. Juni 2002 (2002-06-06) Seite 62, Zeile 21 - Seite 65 Seite 119 Seite 125 Ansprüche 1-12; Abbildungen 11,17,23,25,26; Beispiele 9,10; Tabellen 1-6; Sequenzen 33,56,58 & DATABASE Geneseq 'Online! 16. Oktober 2002 (2002-10-16), "Nod2 exon 11 DNA sequence SEQ ID No 105." gefunden im EBI accession no. GSN:ABT05811 Database accession no. ABT05811 ----- -/--	1-4, 6-8 5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. August 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

25/08/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schmitt, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/000550

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2004/053263 A1 (ABREU MARIA T ET AL) 18. März 2004 (2004-03-18)	1-4,6-8
A	Ansprüche 1-15; Abbildungen 5-7; Beispiel 2; Tabelle 3; Sequenzen 48,50,52 -----	5
X	LESAGE SUZANNE ET AL: "CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS. APR 2002, Bd. 70, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 845-857, XP002340892 ISSN: 0002-9297	1-4,6-8
A	das ganze Dokument -----	5
X	HAMPE J ET AL: "Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, Bd. 359, Nr. 9318, 11. Mai 2002 (2002-05-11), Seiten 1661-1665, XP004790813 ISSN: 0140-6736	6-8
	das ganze Dokument -----	
X	RAHMAN P ET AL: "CARD15: a pleiotropic autoimmune gene that confers susceptibility to psoriatic arthritis." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS. SEP 2003, Bd. 73, Nr. 3, September 2003 (2003-09), Seiten 677-681, XP002340893 ISSN: 0002-9297	1-4,6-8
	das ganze Dokument -----	
X	HUGOT JEAN-PIERRE ET AL: "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 411, Nr. 6837, 2001, Seiten 599-603, XP002177308 ISSN: 0028-0836	1-4,6-8
A	in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	5
	----- -/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2005/000550

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	OGURA YASUNORI ET AL: "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 411, Nr. 6837, 2001, Seiten 603-606, XP002177309 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt	1-4,6-8
A	das ganze Dokument	5
A	WO 03/060468 A (THE PICOWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH) 24. Juli 2003 (2003-07-24) Ansprüche 1,2 das ganze Dokument	1-5
P,X	HOLLER ERNST ET AL: "Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation" BLOOD, Bd. 104, Nr. 3, 1. August 2004 (2004-08-01), Seiten 889-894, XP002340894 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument	1-8

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/000550

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0244426 A	06-06-2002	AU 4341502 A	11-06-2002
		CA 2427471 A1	06-06-2002
		EP 1404712 A2	07-04-2004
		US 2002197616 A1	26-12-2002
		WO 0244426 A2	06-06-2002
US 2004053263 A1	18-03-2004	AU 2003263834 A1	19-03-2004
		EP 1556405 A2	27-07-2005
		WO 2004020968 A2	11-03-2004
WO 03060468 A	24-07-2003	AU 2002364098 A1	30-07-2003
		CA 2471513 A1	24-07-2003
		EP 1468008 A2	20-10-2004
		JP 2005514932 T	26-05-2005
		WO 03060468 A2	24-07-2003
		US 2003215446 A1	20-11-2003